



TITLE:

非ウイルス・ベクターによる膀胱 へのin vivo遺伝子導入法

AUTHOR(S):

杉村, 一誠; 張本, 幸司; 岸本, 武利

CITATION:

杉村, 一誠 ...[et al]. 非ウイルス・ベクターによる膀胱へのin vivo遺伝子導入法. 泌尿器科紀要 1997, 43(11): 823-827

ISSUE DATE:

1997-11

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/116061>

RIGHT:

非ウイルス・ベクターによる膀胱への *in vivo* 遺伝子導入法

大阪市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 岸本武利教授)

杉村 一誠, 張本 幸司, 岸本 武利

IN VIVO GENE TRANSFER METHODS INTO BLADDER
WITHOUT VIRAL VECTORSKazunobu SUGIMURA, Kouji HARIMOTO, Taketoshi KISHIMOTO
From the Department of Urology, Osaka City University Medical School

For the application of gene therapy to bladder cancer, we examined four *in vivo* gene transfer methods without viral vectors. For lipofection cationic liposomes (Lipofectin) were instilled into murine bladders. The hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposomes possessing membrane fusion activity were also injected intraluminally. Using a particle gun, rabbit bladder mucosa was bombarded with DNA-coated gold microcarriers. Electrotransfection was examined in rabbit bladder by pulse direct currents (0.15-0.2 A, 50 msec, repeated 8 times) generated between needle electrodes after submucous injection of DNA solution. β -galactosidase gene and chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene were used as marker genes. Although lipofection was inefficient in normal urothelium, cancerous urothelium was transfected slightly. HVJ-liposomes more efficiently transfected superficial layers of urothelium with a peak of expression on day 5. The particle gun produced non-uniform but efficient transfection in deeper layers of the urothelium. By electrotransfection, submucous interstitial cells were transfected as well as urothelium. No major complications were observed after these four procedures. HVJ-liposomes are potentially useful for the treatment of carcinoma in situ and the latter two methods may be suitable for the adjuvant therapy of localized bladder tumors.

(Acta Urol. Jpn. 43 : 823-827, 1997)

Key Words: Gene transfer, Bladder, Liposome, Particle gun, Electroporation

緒 言

遺伝子治療は癌に対する新しい有力な治療法として基礎的な研究成績が集積されてきており, 米国では1995年現在 RAC に承認された約100の遺伝子治療の臨床プロトコルのうち約半数は癌に対するものである¹⁾。癌に対する遺伝子治療としては, (1) 癌細胞にサイトカイン遺伝子や抗原提示に関わる遺伝子を導入し, 免疫力を高める免疫遺伝子治療 (癌ワクチン), (2) プロドラッグを活性化する遺伝子を癌細胞に導入し, プロドラッグの投与で癌細胞を殺傷する自殺遺伝子治療, (3) アンチセンス・オリゴヌクレオチドやリボザイムによる癌遺伝子の発現の抑制, (4) 変異によって機能を失った癌抑制遺伝子をもつ細胞への正常な癌抑制遺伝子の導入, (5) 強力な化学療法施行時における骨髓幹細胞の多剤耐性遺伝子導入による保護, などが試みられている²⁻⁴⁾。これらの戦略のうち (1) から (4) は癌細胞が遺伝子導入の標的細胞であり, 目標とする細胞に導入する方法 (ターゲティング) がうまくいくならば, 手術等で得た癌細胞に体外で遺伝子を導入し体内に戻すよりも, *in vivo* で直接遺伝子

を導入するほうがはるかに实际的である。ベクターとしてはレトロウイルスやアデノウイルスがこれまでよく用いられているが, ウイルスベクターの安全性は常に議論的であり, 実際アデノウイルスによる免疫原性が臨床治療上の問題となっている¹⁾。安全で効率が良く, 簡単に反復使用が可能な遺伝子導入法の確立は, 遺伝子治療の臨床応用上必須と思われる。

臓器特異性に基づいた膀胱癌治療の特徴として, 薬剤の膀胱内注入療法や内視鏡治療が容易かつ有効であることがあげられる。膀胱癌の遺伝子治療を考えた場合も, このような特性が利用できるであろうことは容易に想像される。我々はここで4つの非ウイルス・ベクターによる膀胱上皮への遺伝子導入法を検討した。すなわち, リポフェクション⁵⁾, HVJ (センダイウイルス)リボソーム⁶⁾の膀胱内注入, 遺伝子銃⁷⁾および電気穿孔法^{8,9)}の膀胱への応用の可能性を検討した。

方 法

実験動物

リポフェクション法およびHVJリボソームの実験には, 雄性SDラットおよび0.1% N-n-Butyl-N-

butan-r-ol-nitrosamine (BBN) を飲水として2カ月間投与し膀胱癌を誘発した雄性 C3H マウスを使用した。動物はネブタール麻酔下で外科的に膀胱を露出し、26G 注射針で膀胱を穿刺し、尿を吸引後にそれぞれの溶液を膀胱内注入した。

遺伝子銃および電気穿孔法の実験には雄性日本白色ウサギを使用した。ネブタール麻酔下で外科的に膀胱を露出、さらに膀胱を切開して露出した粘膜面に対し直視下でそれぞれの操作を行った。操作後、膀胱は吸収糸で縫合した。

リポフェクション

N { 1- (2, 3-dioleoyloxy) propyl } -N, N, N-trimethylammonium chloride (DOTMA, Syntex社、USA) および dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE, Sigma, USA) の1:1混合物でリポソームを作成し(リポフェクチン)⁵⁾、プラスミド DNA とリポフェクチンをそれぞれ Opti-MEN (Gibco) で20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、1:1でインキュベートしたものを0.2 ml/ラットまたは0.05 ml/マウスで膀胱内に注入した。

HVJ リポソーム

HVJ リポソームは金田らの方法によって作成した¹⁰⁾。プラスミド DNA 200 μg を50 μg の核蛋白 HMG-1とインキュベート後、フォスファチジル コリン、フォスファチジル・セリンおよびコレステロール (4.8:1:2) 10 mg から成る脂質膜にボルテックスとソニケーションで封入した。このリポソームを紫外線で不活化した HVJ (30,000 HAU) とインキュベートした後、融合しなかった HVJ をショ糖密度勾配遠心により取り除いた。HVJ リポソームは0.1-0.2 ml (5-10 μg DNA)/ラット、0.05 ml (2 μg DNA)/マウスで膀胱内注入した。

遺伝子銃

高圧窒素ガス (70 psi) を利用した遺伝子銃 (マッハ インパクター KPG-10、関西ペイント社製) を使用した。プラスミド DNA 1 μg を直径 0.5 または 1.0 μm の金マイクロキャリア (徳力本店) 0.6 mg にスベルミジンとカルシウム存在下でコートし¹¹⁾、アルミニウム製の弾丸の前面に付着させた。弾丸は窒素ガスの噴射で加速され銃口部で停止するが、マイクロキャリアは慣性でそのまま目標に向かって飛んでゆく。ウサギ膀胱粘膜面に 3 cm の距離から打ち込んだ。

電気穿孔法

In vivo 電気穿孔法^{8,9)} には Electro Square Porator T820 および Optimizor 500 (BTX 社製) を使用した。ウサギ膀胱粘膜下にプラスミド DNA 100 μg を局所注入後、その部分をはさんで 5-7 mm の距離で平行に粘膜下に刺入した電極間で直流のパルス電流

(0.15-0.2 A, 100-500 V, 50 msec) を生じさせた。このパルス電流を1秒間隔で8回繰り返した。

マーカー遺伝子

遺伝子導入の効率と発現細胞の分布を検討するために、pSV- β -Galactosidase (Promega) をマーカー遺伝子として用いた。遺伝子導入後48時間で膀胱を切除し、凍結切片を1%グルタルアルデヒドで固定した。 β ガラクトシダーゼ (β -gal) 発現細胞は5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) で青染し、背景はヘマトキシリンで染色した。

HVJ リポソームによる導入遺伝子の経時的発現の評価には chloramphenicol acetyl-transferase (CAT) を用いた。pCAT (Promega) を正常ラット膀胱に導入、1から10日目に膀胱を切除、1 ml の 0.25 M Tris-HCl、pH 7.8でホモジナイズし、遠心上清の CAT 活性を Quan-T-CAT (Amersham) で測定した。

結 果

リポフェクション

膀胱内注入後48時間の正常膀胱上皮では、一部の細胞でのみ β -gal の発現が見られた (Fig. 1-A)。一方、BBNで癌化した上皮では、正常膀胱よりは多くの上

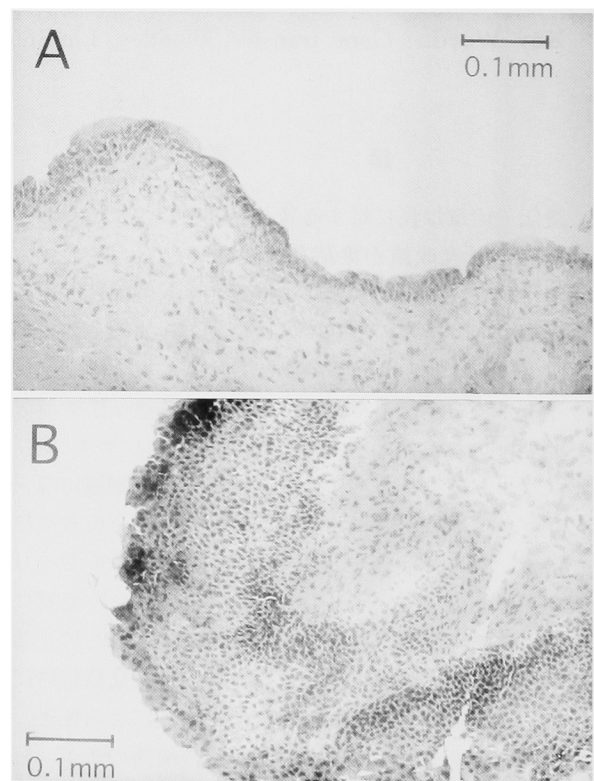


Fig. 1. β -galactosidase expression in urinary bladder 48 hours after intravesical instillation of lipofectin. A, normal rat bladder. B, cancerous urothelium of BBN-treated mouse bladder.

皮細胞で β -gal の発現が認められた (Fig. 1-B).

HVJリポソーム

HVJリポソームの膀胱内注入後48時間で、正常膀胱および癌化した膀胱上皮の表層の大部分で β -gal の発現が認められた (Fig. 2). また、CAT の発現は5日目でピークとなり、徐々に低下するものの10日以上持続した (Fig. 3). HVJ リポソームで遺伝子導入し

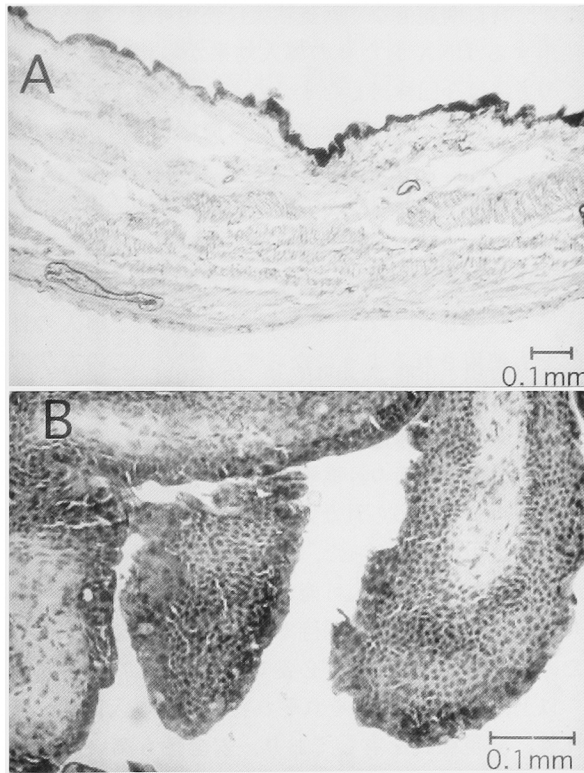


Fig. 2. β -galactosidase expression in urinary bladder 48 hours after intravesical instillation of HVJ-liposomes. A, normal rat bladder. B, cancerous urothelium of BBN-treated mouse bladder.

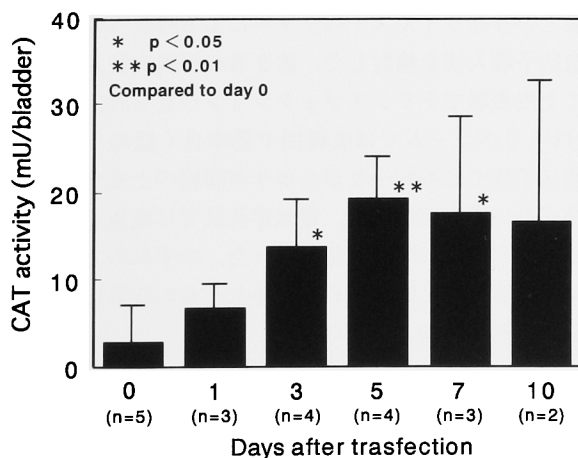


Fig. 3. Chloramphenicol acetyl-transferase (CAT) activity of normal rat bladder after HVJ-liposome mediated transfection.

た膀胱に異常は認めなかった。また、感染能をもつ HVJ はラット、マウスで呼吸器感染症など病原性を現わすが¹²⁾, HVJ リポソーム注入後そのようなエピソードは見られなかった。

遺伝子銃

遺伝子銃が標的とした部位のウサギ膀胱上皮では、均一ではなく斑状に集合した強い発現細胞が認められた (Fig. 4). β -gal の発現強度でみる限り、個々の細胞の発現は今回検討した4つの方法では最も強く、発現は少なくとも2週間後も認められた。直径 $0.5 \mu\text{m}$

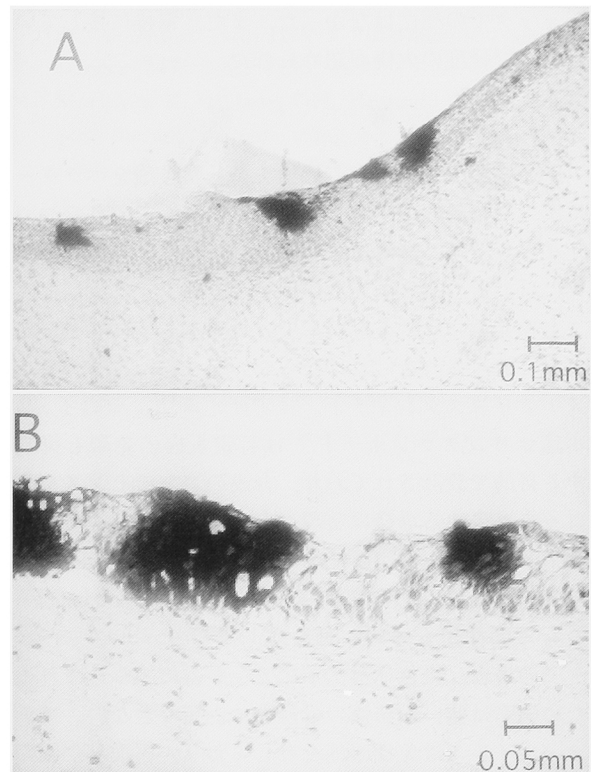


Fig. 4. β -galactosidase expression in normal rabbit bladder 48 hours after particle gun bombardment. A, gold microcarriers $0.5 \mu\text{m}$ in diameter were used. B, gold microcarriers $1.0 \mu\text{m}$ in diameter were used.

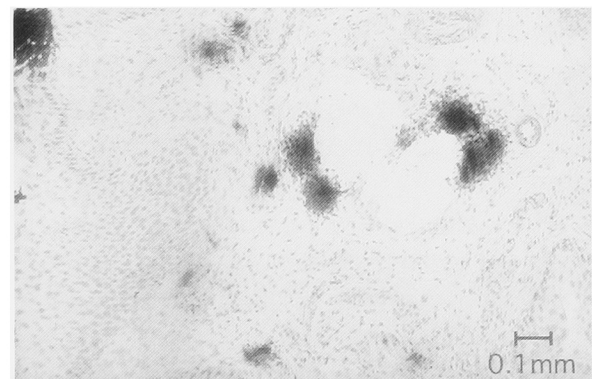


Fig. 5. β -galactosidase expression in normal rabbit bladder 48 hours after the electrotransfection.

のマイクロキャリア使用時には粘膜上層が主として発現を示したのに対し、直径 $1.0\mu\text{m}$ のマイクロキャリア使用時には粘膜全層および一部の粘膜下層で $\beta\text{-gal}$ の発現が認められた (Fig. 4-B). 遺伝子銃発射直後には、標的部分で軽度の出血が見られたが、その他とくに問題となるような組織の損傷や合併症は認められなかった。

電気穿孔法

電気穿孔法では DNA を局所注入した部分の粘膜下組織および粘膜の一部で $\beta\text{-gal}$ の発現が認められた (Fig. 5). 通電時に筋肉の収縮が見られたが、電気ショックでの死亡はなかった。また、電極に接している部分で軽度の火傷が認められた。

考 察

遺伝子治療は、特定の機能を持った核酸をベクターによって標的細胞へ導入することによって成り立つ。サイトカイン、酵素などの機能的産物を発現させるためには、その遺伝子をウイルスベクターによって、または発現プラスミドの形で非ウイルスベクターによって導入されなければならない。一方、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム¹³⁾、デコイ2本鎖オリゴヌクレオチド¹⁴⁾は特定蛋白の発現を抑制する目的で設計されており、合成のアンチセンスやデコイを導入する場合は発現ベクターシステムやウイルスベクターは不要である。ウイルスベクターには導入と発現の効率が高いという長所があるが、問題となる副作用も多い。例えばレトロウイルスベクターの場合、染色体遺伝子にランダムに組み込まれるため確率は低いが発癌の可能性は否定できない。アデノウイルスは免疫原性を有しており、再投与が困難な症例もある¹⁾。変異や組み替えによって病原性や増殖性を有する野性株が出現する可能性も否定できない。これらの理由からウイルスベクターを用いない *in vivo* での遺伝子導入法の臨床応用の可能性について検討した。

リポフェクションは *in vitro* で用いる場合には細胞毒性が指摘されているが、膀胱内注入として使用した場合、特に問題はないように思われる。導入効率があり良くないので繰り返して注入する必要があると思われるが、準備、生成が簡単なので実用的かもしれない。

HVJの膜融合能を利用したHVJリポソームにより、膀胱上皮表層はより効果的に遺伝子導入された。このシステムでのHVJの役割は、エンベロープのF蛋白の膜融合能に依存しており、一般のウイルスベクターのようなウイルスゲノムの関与はないので、それに由来する問題点も無い。 $\beta\text{-gal}$ の発現から見ると、HVJリポソームは表在性膀胱腫瘍とくに上皮内

癌(CIS)の治療に有利な遺伝子導入のパターンを有しており、サイトカイン遺伝子や自殺遺伝子の導入により有効な治療法となる可能性が高い。

以上の2つの方法はリポソームを利用した化学的導入法であるのに対し、このあとの2つの方法は物理的な力を利用した導入法である。

遺伝子銃は皮膚への遺伝子導入に応用された報告はあるものの¹¹⁾、粘膜上皮への応用例は報告がなかったが、特に問題もなく膀胱粘膜に使用可能であった。使用するDNAあたりの導入効果から比較すると、この方法は今回検討した4つの方法のなかでは最も効率がすぐれていた。準備や操作も簡単なことから、装置の洗練化によって臨床応用は十分に期待できる。

電気穿孔法は従来より *in vitro* では遺伝子導入に広く用いられてきた。*in vivo* では遺伝子導入よりもむしろ抗癌剤の細胞への取り込みを増加させる電気化学療法¹⁵⁾として応用されてきたが、最近遺伝子導入の目的でも使用されるようになってきた^{8,9)}。この方法の特徴は、細胞へ導入するためのベクターを必要としない点であるが、通電による細胞の傷害と導入効率が問題点である。今回の針電極を使った検討では、組織の傷害はあまり認められなかったが、DNAあたりの導入効率はかなり低かった。粘膜表層だけでなく、電極の挿入可能域まで導入可能というのは大きな利点であり、浸潤癌への応用も期待できるが、導入効率向上のための至適条件の検討が必要であろう。

以上、4つの方法はそれぞれ特徴的な導入原理、操作性、発現様式を有しており、安全性も高いことから、膀胱癌に対する臨床応用の可能性は十分にあると考えられる。

結 語

膀胱癌に対する遺伝子治療を想定して、リポフェクション、HVJリポソーム、遺伝子銃および電気穿孔法という非ウイルスベクターによる膀胱への *in vivo* 遺伝子導入法を検討した。前2者の膀胱内注入によって上皮表層でトランスフェクションが見られ、とくにHVJリポソームでは広範囲で効率良く認められた。遺伝子銃では不均一ながらウサギ膀胱の上皮全層での効率良い導入が得られ、電気穿孔法では電極を挿入した粘膜下層での導入が認められた。いずれの方法も組織傷害等とくに認められず、それぞれの特徴にあった臨床応用が可能と考えられた。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金および大阪市立大学医学部受託研究費によって行われた。

文 献

- 1) Marshall E: Gene therapy's growing pains. Science

- 269: 1050-1055, 1995
- 2) Pandha HS and Sikora K: Gene therapy for urological cancer. *Br J Urol* **75** (Suppl. **1**): 67-74, 1995
 - 3) Anderson MD: Gene therapy for cancer. *Hum Gene Ther* **5**: 1-2, 1994
 - 4) 新津洋司郎, 高橋 稔, 佐藤康史: 癌に対する遺伝子治療. 遺伝子治療, 小澤敬也編. pp.26-32, 羊土社, 東京, 1997
 - 5) Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al.: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7413-7417, 1987
 - 6) Kato K, Nakanishi M, Kaneda Y, et al.: Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver. *J Biol Chem* **266**: 3361-3364, 1991
 - 7) Yang N-S, Burkholder J, Roberts B, et al.: *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9568-9572, 1990
 - 8) Heller R, Jaroszeski M, Atkin A, et al.: *In vivo* gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett* **389**: 225-228, 1996
 - 9) Nishi T, Yoshizato K, Yamashiro S, et al.: High-efficiency *in vivo* gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following *in vivo* electroporation. *Cancer Res* **56**: 1050-1055, 1996
 - 10) Kaneda Y: Virus (Sendai virus envelopes) mediated gene transfer. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Edited by Celis JE. pp.50-57, Academic Press, San Diego, 1994
 - 11) Andree C, Swain WF, Page CP, et al.: *In vivo* transfer and expression of a human epidermal growth factor gene accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12188-12192, 1994
 - 12) Homma M and Tashiro M: Sendai virus. In: *Encyclopedia of Virology*. Edited by Webster RG and Granoff A. pp.1300-1304, Academic Press, London, 1994
 - 13) Sarver N, Cantin EM, Chang PS, et al.: Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science* **247**: 1222-1225, 1990
 - 14) Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, et al.: A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5855-5859, 1995
 - 15) Belehradek M, Domenge C, Lubinski B, et al.: Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical I-II trial. *Cancer* **72**: 3694-3700, 1993

(Received on August 21, 1997)
(Accepted on September 4, 1997)